Arnaldoa 23 (1): 171 - 184, 2016

ISSN: 1815-8242 (edición impresa)
ISSN: 2413-3299 (online edition)

Propóleo peruano en el desarrollo de un enjuague bucal con actividad antibacteriana

Peruvian propolis for the development of a mouthwash with antibacterial activity

Carmen Isolina Ayala Jara, Ericson Felix Castillo Saavedra & Luis Graus Mejía
Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo, Perú
Email: ayalajara27@hotmail.com

Juan Casanova Luján
Laboratorio de Bromatología, Municipalidad Provincial de Trujillo, Perú

Luis Ernesto Seclén Ayala
Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Trujillo, Perú

Recibido: 25 - 01 - 2016, aceptado 24 - 04 -2016; publicado junio 2016

Resumen

El estudio tuvo como propósito desarrollar un enjuague bucal con extracto de propóleo peruano y evaluar su actividad antibacteriana *in vitro* en cepas estandarizadas de *Streptoccocus mutans* ATCC 35668, principal responsable de la caries dental. El desarrollo del enjuague bucal consistió en diferentes fases: colección y almacenamiento de las muestras, preparación de las muestras de propóleos para los ensayos, determinación de caracteres organolépticos, identificación de metabolitos, determinación de características fisicoquímicas, obtención del extracto de propóleo, determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida, composición del enjuague bucal, estudio de preformulación, control de calidad del enjuague bucal con propóleo, y evaluación de su efecto antibacteriano *in vitro* en cepas de *Streptococcus mutans*. La concentración mínima bactericida de propóleo fue de 1,5ug/mL obtenida mediante un piloto previo. Los resultados obtenidos determinaron que el enjuague bucal a base de propóleo puro tiene mayor promedio de halo de inhibición en relación a las diluciones 1:2, y 1:4 con diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$). El enjuague bucal elaborado a base de propóleo peruano, tiene calidad farmacéutica y efecto antibacteriano *in vitro* frente a cepas de *Streptococcus mutans*.

Palabras clave: Propóleo, enjuague bucal, caries dental, *Streptoccocus mutans*.

Abstract

The research was aimed to develop a mouthwash with Peruvian propolis extract and to evaluate its *in vitro* antibacterial activity in *Streptococcus mutans* ATCC 35668 standardized strains, main responsible for dental caries. Mouthwash development consisted in different phases: collection and storage of samples, preparation of samples for testing propolis, determining organoleptic characteristics, metabolite identification, determination of physicochemical characteristics, obtaining a propolis extract, determining the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration, composition of mouthwash, preformulation study, quality control mouthwash with propolis, and evaluation of antibacterial effects of propolis in oral wipe strains of *Streptococcus mutans*. The minimum bactericidal concentration of propolis was 1,5ug / mL obtained by a previous pilot. The results determined that mouthwash with pure propolis has highest average zone of inhibition relative to the dilutions 1: 2 and 1: 4 with statistically significant difference ($p <0.05$). Mouthwash made from Peruvian propolis, has pharmaceutical quality and antibacterial effect *in vitro* against strains of *Streptococcus mutans*.

Keywords: Propolis, mouthwash, dental caries, *Streptococcus mutans*.

Introducción

La caries dental es una de las enfermedades de etiología bacteriana más comunes entre los seres humanos, y es considerada como un problema de salud pública en muchas partes del mundo, debido a que afecta la calidad de vida y personalidad de los individuos que la padecen; además, requiere de una inversión personal y gubernamental importante (Kinane, 2000; Navarro, 2002).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que unos 5,000 millones de personas han sufrido caries dental (Kinane, 2000). El Perú, es uno de los países en vías de desarrollo de Latinoamérica que tiene la más alta incidencia de caries, una enfermedad dental que afecta al 95% de la población, es decir, a nueve de cada diez personas, principalmente niños entre 5 y 12 años de edad (Chumpitáz & Ghezzi, 2013).

Durante los últimos 20 años, los principales factores biológicos que han sido utilizados como indicadores de

actividad de caries dental, según estudios microbiológicos, han establecido que los microorganismos que forman parte importante de la población bacteriana de la placa y que son considerados los principales agentes cariogénicos son las variedades de *Streptococcus mutans, sobrinus, cricetus, salivarius* y *sanguis* con algunas especies de lactobacilos; que generan una elevada producción de ácidos (Castro, 2005; Hidalgo, 2006).

S. mutans es el principal microorganismo aislado en lesiones cariosas humanas, primero en colonizar la superficie del diente después de la erupción. Su nombre lo recibe de su tendencia a cambiar de forma, y se puede encontrar como coco o de forma más alargada, como bacilo (Castro, 2005; Moromi, 2007). Del mismo modo, representa un microorganismo acidogénico que produce ácido láctico, interviniendo en la desmineralización del diente; es acidófilo porque puede sobrevivir y desarrollarse en un pH bajo; y acidúrico porque es capaz de seguir generando ácido con un pH bajo (Pérez, 2007).

Los *S. mutans* presentes en la biopelícula de la placa bacteriana supragingival, mediante sus factores de virulencia son capaces de provocar la pérdida de minerales y posterior formación de una cavidad, debido al desequilibrio iónico en el proceso de mineralización y desmineralización de los tejidos duros del diente, resultante del metabolismo de carbohidratos por parte de estas bacterias (Castro, 2005; Pérez, 2007).

La producción de polisacáridos es fundamental para la colonización y mantenimiento de este microorganismo en el diente. Por otra parte, *S. mutans* puede sintetizar polisacáridos intracelulares, le permite obtener energía y conservar la producción de ácido láctico durante largos periodos. También produce dextranasas y fructanasas. Estas enzimas metabolizan los polisacáridos extracelulares, lo cual favorece la producción de ácido (Pérez, 2007).

El propóleo es una mezcla compleja de origen biológico elaborado a partir de resinas, bálsamos, gomas y otras exudaciones de las plantas, que la "abeja" *Apis mellifera* recoge y modifica, adicionándole cera, polen y enzimas entre otros materiales, con el propósito de proteger la colmena de las adversidades del medio, asegurando estabilidad térmica y protección contra problemas microbiológicos. Su color puede variar desde amarrillo verdoso, verde oscuro a marrón oscuro. El aroma puede ser placentero a yemas de "álamo", miel, ceras y vainilla o se puede relacionar con la flora nativa del sector, en algunos casos el propóleo puede ser amargo, picante y hasta astringente (Álvarez, 2012; Pascual *et al.*, 1994).

Por su consistencia, los componentes presentes en los propóleos pueden clasificarse en dos grupos; los de naturaleza fluida, los bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son agentes volátiles; los bálsamos son de consistencia más densa, poco volátiles y con frecuencia sufren reacciones de polimerización; mientras que las oleorresinas llevan asociado el aroma de las plantas en forma concentrada, son líquidos viscosos de consistencia semisólida. La solubilidad depende de la forma en que se encuentren, el número y las clases de constituyentes presentes. El propóleo presenta una consistencia variable, dependiendo de su origen y de la temperatura. Hasta los 15°C es duro y se torna maleable a medida que ésta aumenta. Su punto de fusión varía entre 60 a 70°C, llegando en algunos casos hasta 100°C (Álvarez *et al.*, 2006; Pascual *et al.*, 1994).

Los flavonoides y los compuestos fenólicos son considerados los principales compuestos bioactivos del propóleo. Los flavonoides constituyen alrededor del 4% del total del peso del propóleo, los más comunes encontrados son la quercetina, apigenina, kaempferol, pinocembrina, galangina, y hesperidina. Por otro lado, los compuestos fenólicos encontrados frecuentemente son los ácidos caféico, isoferúlico, cinámico, benzoico y algunos de sus ésteres (Bankova, 2000; Greenaway *et al.*, 1991; Maidana, 2000).

El propóleo, presenta propiedades bacteriostáticas, antifúngicas, anestésicas y cicatrizantes. Actualmente por sus propiedades cicatrizantes se utiliza particularmente en dermatología, aunque se busca conocer más posibilidades de aplicación (Cuéllar *et al.*, 1990; Khayya *et al.*, 1993).

La Organización Mundial de la Salud promueve el desarrollo de sistemas terapéuticos en base a productos naturales medicinales, debido a que aproximadamente el 80% de la población mundial lo emplea para resolver sus problemas de salud (Hidalgo, 2006; Kinane, 2000). Es así, que en nuestro país, y específicamente en nuestra región son muy frecuentes las caries dentales, producto de los malos hábitos de higiene y/o mal nutrición que disminuye las defensas del organismo, además de factores culturales (Navarro, 2002).

Por otro lado, el uso tradicional del propóleo como sustancia medicinal a través de la historia de la humanidad, permite predecir su aceptación en forma de un producto farmacéutico que sería el resultado de un proceso tecnológico sustentado en la ciencia y tecnología farmacéutica.

En este contexto, se plantea como objetivo desarrollar un enjuague bucal con extracto de propóleo y evaluar su efecto antibacteriano *in vitro* frente a cepas de *S. mutans*.

Material y métodos

Material

Se utilizó como material biológico cepas estandarizadas de *S. mutans* ATCC 35668, y como material de estudio propóleo recolectado de las colmenas de *Apis mellifera* de Perú. Dpto. La Libertad, Prov. Otuzco, Distrito Charat.

Método

El desarrollo del enjuague bucal consistió en diferentes fases: colección y almacenamiento de las muestras, preparación de las muestras de propóleos para los ensayos, determinación de caracteres organolépticos, identificación de metabolitos presentes en el propóleo, determinación de características fisicoquímicas, obtención del extracto de propóleo, determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB), composición del enjuague bucal, estudio de preformulación, control de calidad del enjuague bucal con propóleo, y evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* del enjugue bucal de propóleo en cepas de *S. mutans.*

La colección y almacenamiento de las muestras de propóleos se realizó entre los meses de julio y agosto, y se emplearon 500 g. de propóleo. El método de colección consistió en el raspado clásico de las partes superiores de la colmena, y se colocaron directamente en bolsas oscuras de polietileno. Posteriormente, se guardaron en refrigeración y al abrigo de la luz.

La preparación de las muestras de propóleos para los ensayos consistió en eliminar las impurezas visibles de cada muestra, se fraccionaron en trozos de 2 cm

de tamaño aproximadamente, se colocaron en un vaso de precipitación y se llevaron a refrigerar a 0ºC por 12 horas. Luego se trituraron en mortero y se mezclaron con espátula, la muestra se dividió en dos partes, para realizar los ensayos organolépticos, químicos, físicos; y los ensayos microbiológicos (Reitinger, 2000; Salamanca, 2000).

Los caracteres organolépticos se realizaron mediante un análisis descriptivo de categorización cuantitativa relativa. Se utilizaron escalas numéricas de evaluación para la asignación de puntuaciones acorde a la intensidad del estímulo causado por los descriptores establecidos en la literatura de propóleos de Sudamérica y otras partes del mundo, hasta obtener las características que más se ajustan a la realidad de la muestra analizada. Las propiedades organolépticas evaluadas estuvieron basadas en parámetros establecidos por la Norma Rusa RST-RSFSR-317-77 y la Norma Húngara MSZ-08-0184-79 (Norma Ramal de Hungría, 1997; Norma Rusa, 1997).

La identificación de metabolitos presentes en el propóleo consistió en pesar 5 g de muestra, se molió y se procedió según las técnicas y procedimientos de la marcha fitoquímica preliminar descrita por Olga Lock de Ugaz (Lock, 1994).

Las características fisicoquímicas se evaluaron según los parámetros y metodologías de trabajos establecidos en la Norma Rusa RST-RSFSR-317-77 y Norma Húngara MSZ-08-0184-79. Los parámetros evaluados fueron: punto de fusión, contenido de cera, impurezas mecánicas, compuestos fenólicos, resinas totales, compuestos fenólicos, índice de oxidación, índice de yodo, índice de acidez, índice de saponificación e índice de ésteres (Lock, 1994; Norma Ramal de Hungría, 1997; Norma Rusa, 1997).

La obtención del extracto de propóleo consistió en enfriar la muestra hasta 0ºC, luego se pesaron 20 gramos, y se transfirieron a un matraz de 250 mL y se le añadieron 200 mL de etanol de 80º, se sometió a reflujo en equipo Soxhlet durante una hora, al cabo de este tiempo se detuvo y se filtró a través de papel filtro Whatman Nº 40; se separó el filtrado y el sólido residual se sometió nuevamente a reflujo con 200 mL de solvente correspondiente, el nuevo filtrado obtenido se reunió con el anterior, siendo éste el extracto total final. Los extractos totales finales se transfirieron al matraz de un rotavapor tipo Büchi y se mantuvo en evaporación hasta la desaparición del solvente. El sólido que se obtuvo se sometió a secado en estufa a 70ºC durante 2 horas, para obtener el denominado extracto blando total (Álvarez *et al.*, 2006).

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto de propóleo consistió en realizar pruebas de sensibilidad con cepas estandarizadas de *S. mutans* ATCC35668, a distintas concentraciones del extracto de propóleo para la determinación de la CMI y CMB, más adecuada que debe utilizarse en la elaboración del gel (Carrillo *et al.*, 2011).

El enjuague bucal estuvo compuesto por extracto de propóleo, glicerina, agua, alcohol, edulcorantes, aromatizantes, saborizantes y antioxidantes. Los excipientes utilizados son de uso generalizado para esta forma farmacéutica. El enjugue bucal obtenido se preservó de la luz debido a la fotosensibilidad del extracto de propóleo (Chimenos & López, 2010).

En el estudio de preformulación se colocó el extracto en proporciones adecuadas con cada uno de los excipientes de la

formulación. Se envasaron las muestras en frascos ámbar y se colocaron a temperatura ambiente por un mes, valorando aspectos organolépticos y pH. Las determinaciones se realizaron a tiempo cero, 7, 15 días y 30 días (Chimenos & López, 2010; Maidana, 1999).

El control de calidad del enjuague bucal con propóleo se basó en la descripción del producto (aspecto, color, olor, sabor y evaluación de la sensación al aplicar en la cavidad bucal), nivel de acidez (pH), ensayos de estabilidad (estudios acelerados en estufa a 40ºC durante 3 a 8 días y luego en refrigerador a 4ºC por un período de tiempo igual) y control microbiológico (método de Recuento Total de Bacterias Aerobias Mesófilas Viables) (Woisky & Salatino, 1998).

En la evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* del enjugue bucal de propóleo en cepas de *S. mutans* se empleó el método de Difusión en Agar, que consistió en la preparación de la muestra del enjugue bucal de propóleo a partir de una solución concentrada del enjugue bucal con propóleo, y se utilizó agua destilada para obtener diluciones de 1/2, 1/4 y 1/8; y posteriormente en un test de difusión en agar para la verificación de la acción antibacteriana del enjugue bucal de propóleo sobre cepas patrón de *S. mutans* ATCC 35668 (Vieira, 1999).

Los datos obtenidos de la evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* del enjugue bucal a base de propóleo sobre cepas de *S. mutans* fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza, prueba de Kruskal Wallis y la prueba de Duncan para un nivel de significancia de 5% (Carrillo *et al.*, 2011; Castro, 2005).

Resultados y discusión

El estudio se inició con el análisis sensorial, que permitió establecer los atributos correspondientes a las características organolépticas evaluadas en la muestra de propóleo peruano, materia prima con la que se elaboró el enjuague bucal (Tabla 1).

Tabla 1. Características organolépticas evaluadas en la muestra de propóleo peruano.

Característica organoléptica	Atributos
Estructura	Heterogénea
Aspecto	Trozos irregulares opacos
Consistencia	Poco blanda
Color	Naranja con tintes verdes
Olor	Resinoso muy aromático
Sabor	Amargo
Impurezas Visibles	Capullos de pollas Virutas de madera

La estructura observada en la muestra fue heterogénea; estos resultados coinciden con otros estudios publicados y confirman que la estructura del propóleo está directamente relacionada con el desarrollo de una buena técnica de recolección; y que las deformaciones heterogéneas se deberían a impurezas no visibles que al entrar en la colmena habrían sido recubiertas con el propóleo (Maidana, 1999).

La consistencia fue poco blanda, y coincide con otros estudios previamente publicados que indican que la consistencia estaría directamente relacionada con la temperatura de la zona de recolección, e inversamente con la altitud; es decir, a mayor altitud, menor temperatura y la consistencia es más dura. Otro de los factores que influirían en la consistencia, es la clase y la naturaleza de los componentes presentes en el propóleo, que serían oleorresinosos; lo que le confiere la consistencia semisólida y que llevaría asociado el olor característico de la flora de la zona de origen (Maidana, 1999; Salamanca, 2000).

El color hallado en la muestra fue naranja con tintes verdes; estudios realizados han determinado que el color del propóleo está en función a varios factores; la parte del vegetal que sería utilizada por la "abeja" para su elaboración (flores, brotes o resinas) y específicamente a los flavonoides encontrados (Bruneton, 2001; Sosa *et al.* 2000). En la zona de recolección de la muestra predominan los árboles frutales y arbustos con muchas flores (Álvarez, 2012; Horna, 1995; Mostacero, 2002).

El olor identificado en la muestra fue resinoso muy aromático debido a la presencia de compuestos alifáticos de bajo peso molecular, alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres, así como mono y diterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos (Álvarez, 2012; Maidana, 1999).

El sabor determinado en la muestra fue amargo, estudios realizados señalan que la variabilidad en el sabor del propóleo se debería a la cantidad y clase de compuestos resinosos, presentes en la flora, de la cual la "abeja" obtiene la materia prima para elaborar el propóleo, así como cera, restos vegetales y presencia de algunos contaminantes (Bankova, 2000; Reitinger, 2000).

Al comparar los resultados obtenidos del análisis de las características organolépticas según la Norma Rusa RST-RSFSR-317-77 sobre control de calidad de propóleo, se observa que la muestra cumple con los parámetros establecidos (Norma Rusa, 1997).

El análisis de metabolitos secundarios en la muestra determina la presencia de taninos, flavonoides, cardenólidos, alcaloides, leucoantocianidinas y ausencia de saponinas, esteroides/triterpenos y quinonas (Tabla 2); y estaría indicando que la flora que visitan las "abejas" es común, debido a la existencia de similares especies vegetales, además la presencia de leucoantocianidinas se podría deber a la presencia de árboles apícolas presentes en la zona de origen de la muestra (Hegazy & Hady, 2000; Tolosa & Cañizares, 2002).

El valor del punto de fusión medio, fue de 83,1°C, y estaría relacionado a la temperatura en la zona de origen del propóleo, así como a su composición.

El promedio del índice de oxidación, determinado en segundos, encontrado en la muestra fue 19,6 inferior al valor máximo de 22; admitidos por normas internacionales sobre calidad del propóleo. Estudios previos han determinado los factores que influyen en el índice de

Tabla 2: Metabolitos secundarios identificados en la muestra de propóleo peruano.

Metabolitos	Resultados
Saponinas	-
Taninos	+
Flavonoides	+
Esteroides/Triterpenos	-
Quinonas	-
Cardenólidos	+
Leucoantocianidinas	+
Alcaloides	+

oxidación que en el caso del propóleo sería; el contenido de compuestos fenólicos y los ácidos no fenólicos insaturados, el alto contenido de ceras (directamente los ácidos grasos insaturados de cadena abierta) y por último el contenido de impurezas (algunas sustancias reductoras u oxidantes) (Bankova, 2000; Maidana, 2000).

El contenido de cera fue de 29,5 % p/p, muy cercano al límite establecido por la Norma Rusa que lo establece en no mayor de 30%. La cantidad de resinas totales fue de 40,8%, y representa la fracción útil del propóleo, y su contenido es condicionado por la riqueza de resinas en la flora de la zona de origen, la época de recolección (en otoño se produce mayor cantidad de resinas en la flora) y la variedad de especies vegetales (Maidana, 2000).

El contenido de impurezas mecánicas en la muestra analizada fue 19,56 %, concordante con lo que establece la Norma Rusa, en no mayor de 20% (Norma Rusa, 1997). Diversos estudios indican que las impurezas mecánicas están conformadas en su mayoría por partículas de polvo, partes de plantas, insectos y algunas sustancias minerales que las "abejas" introducen en la colmena como consecuencia de la contaminación ambiental (Álvarez, 2012; Maidana, 1999; Reitinger, 2000).

El contenido de los compuestos fenólicos fue de 48,95%, valor que se encuentra dentro de los parámetros que establece la Norma Rusa; que lo fija en un mínimo de 30%. Según algunos estudios realizados indican que el contenido de compuestos fenólicos en el propóleo es inverso al índice de oxidación y estaría en función a la diferencia de especies botánicas de la zona de origen y la variedad de "abeja" (Maidana, 1999; Woisky & Salatino, 1998).

El índice de yodo de la muestra fue 37,90 mg KOH/g, valor permitido por la Norma Rusa, que establece el índice de yodo en no menor a 35% (Norma Rusa, 1997). El índice de yodo determina el grado de insaturación de la materia grasa (ácidos grasos poliinsaturados beneficiosos para el organismo), es decir nos permite inferir sobre la calidad de la cera; en relación a la composición del propóleo.

El índice de acidez 49,8 mg KOH/g, valor situado dentro de los parámetros

establecidos por la Norma Húngara MSZ-08-0184-79 en 42-52 mg KOH/g (Norma Ramal de Hungría, 1997). Estudios publicados, indican que la acidez del propóleo, se debe principalmente a los ácidos libres en la cera y en menor medida a los compuestos fenólicos de naturaleza ácida derivados del ácido benzoico, cinámico, ferúlico entre otros, y algunas clases de flavonoides, de tal manera que una variación en el contenido o clase de estas sustancias, es una posible razón para la variación del índice de acidez (Reitinger, 2000). Los ácidos libres en la cera dependen directamente de la flora y el tipo de "abeja" y los ácidos fenólicos dependen del tipo de flora en la zona de recolección (Maidana, 1999; Maidana, 2000).

El índice de saponificación de la muestra fue 141,2 mg KOH/g, valor que se encuentra dentro de los parámetros establecidos por la Norma Húngara que establece como rango 136 - 221 mg KOH/g (Norma Ramal de Hungría, 1997). La sustancia saponificable en el propóleo son los ácidos grasos libres, ácidos fenólicos y sus respectivos esteres, que se encuentran en la cera y las resinas, las cuales influyen considerablemente en la calidad del propóleo.

El índice de ésteres de la muestra fue 90,27 mg KOH/g. Estos índices: yodo, acidez, saponificación y ésteres, son indicadores importantes para el uso de propóleo en las elaboraciones de cremas, geles y enjuagues utilizadas en la industria cosmética (Chimenos & López, 2010).

Tabla 3. Características fisicoquímicas de las muestras de propóleo peruano.

Características Fisicoquímicas	Resultados
Punto de fusión (°C)	83,1
Índice de oxidación (seg)	19,6
Índice de yodo (mg KOH/g)	31,2
Índice de acidez (mg KOH/g)	49,8
Índice de saponificación (mg KOH/g)	141,2
Índice de ésteres (mg KOH/g)	90,27
Contenido de ceras (%p/p)	37,5
Resinas totales (%p/p)	40,8
Impurezas mecánicas (%p/p)	19,6
Compuestos fenólicos (%p/p)	48,9

En el estudio de preformulación se evaluó la posibilidad de interacción entre el propóleo y los componentes de la formulación en ensayo (Tabla 4), observándose que no ocurrieron cambios en los parámetros analizados. La influencia de los excipientes en la estabilidad física del producto aportó datos valiosos y necesarios para seleccionar la formulación final.

Para el control de calidad del producto se llevó a cabo el análisis de los parámetros fisicoquímicos característicos de este tipo de formulación (Tabla 5), apreciándose características organolépticas, físicas y químicas aceptables.

Los excipientes utilizados para la elaboración del enjuague bucal son de uso generalizado para esta forma farmacéutica

Tabla 4. Interacción de los excipientes con el extracto de propóleo peruano.

Interacción	pH				Características Organolépticas			
	0 días	7 días	15 días	30 días	0 días	7 días	15 días	30 días
Extracto + Glicerina	6,1	6,2	6,1	6,1	No se aprecian cambios			
Extracto + Sacarina	6,5	6,5	6,5	6,5	No se aprecian cambios			
Extracto+ Esencia menta	5,1	5,2	5,1	5,2	No se aprecian cambios			

Tabla 5. Calidad organoléptica del enjuague bucal con extracto de propóleo peruano.

Característica organoléptica	Atributos
Aspecto	Liquido
Color	Ámbar
Olor	Menta, ligeramente resinoso
Sabor	Menta, ligeramente dulce

(Vieira, 1999). El control de calidad del enjuague terminado se realizó por evaluación de sus características organolépticas, pH, estabilidad y control microbiológico. En el análisis de la evaluación de la sensación al aplicar en la cavidad bucal, no se manifestó rechazo alguno, lo que le proporciona buena tolerancia al enjuague.

Los ensayos de estabilidad en estantería y acelerados, mostraron que no hay variación en ninguno de los parámetros analizados pH, características organolépticas del producto como aspecto, color, olor, sabor. Los excipientes y cantidad de los mismos utilizados en el desarrollo de esta formulación, proporcionan al producto estabilidad y de acuerdo a los resultados de los ensayos realizados el enjuague bucal de propóleo a una concentración de 1,5 µg/mL, se estima un plazo de validez de dos años (Tablas 6 y 7). En el control microbiológico del enjuague bucal (Tabla 8), los resultados se encontraron dentro del límite microbiano permitido por las especificaciones internacionales.

Los ensayos del control de calidad del enjuague bucal elaborado se hicieron según regulaciones actuales vigentes en el país, obteniéndose resultados satisfactorios, que aseguran la obtención final de un producto de alta calidad.

Tabla 6. Nivel de acidez y características organolépticas del enjuague bucal con extracto de propóleo peruano.

Enjuague bucal de propóleo	pH	Características organolépticas
0 días	7,25	No se aprecian cambios
7 días	7,25	No se aprecian cambios
15 días	7,25	No se aprecian cambios
1 mes	7,25	No se aprecian cambios
2 meses	7,25	No se aprecian cambios
3 meses	7,25	No se aprecian cambios

Tabla 7. Estabilidad del enjuague bucal con extracto de propóleo peruano.

Temperatura	Estufa 40ºC	Refrigerador 4ºC
Enjuague bucal de propóleo	No se aprecian	No se aprecian

Tabla 8: Calidad microbiológica del enjuague bucal con extracto de propóleo peruano.

Ensayo de límite microbiano	Especificaciones	Resultados
Recuento total de microorganismos aerobios mesófilos viables	< 1000 ufc/mL	< 10 ufc/mL
Salmonella spp	Ausente/ mL	Ausente/ mL
Pseudomona aeruginosa		
Escherichia coli	Ausente/ mL	Ausente/ mL
Staphylococcus aureus		
Recuento total combinado de hongos y levaduras	Ausente/ mL	Ausente/ mL
	Ausente/ mL	Ausente/ mL
	< 100 ufc/mL	< 10 ufc/mL

Tabla 9. Promedio de halos de inhibición (mm) del enjuague bucal de propóleo y control negativo sobre *S. mutans* ATCC 35668

Enjuague Bucal	Ni	Grupos para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
Enjuague bucal sin propóleo	5	0,34				
Enjuague bucal con propóleo 1:8	5		1,38			
Enjuague bucal con propóleo 1:4	5			7,93		
Enjuague bucal con propóleo 1:2	5				10,27	
Enjuague bucal con propóleo	5					26,32

En la evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* del enjuague bucal sobre las cepas de *S. mutans*, la prueba de Duncan evidencia la existencia de grupos estadísticamente diferentes y ordenados por tamaño de halo de inhibición, así el ordenamiento va del grupo 1 (Enjuague bucal sin Propóleo) que tiene el menor promedio de halo de inhibición hasta el grupo 5 (Enjuague bucal con Propóleo) que tiene el mayor promedio de halo de inhibición; y en relación a este análisis, se verificó que el enjuague bucal puro y las diluciones 1: 2, y 1: 4 del enjuague bucal evaluado, presentaron acción antibacteriana con formación de halos de inhibición superiores a 7,93 mm (Tabla 9), siendo estadísticamente significativos ($p<0,05$).

Conclusión

El enjuague bucal desarrollado a base de propóleo peruano presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a cepas de *S. mutans*.

Literatura citada

Álvarez, S. 2012. Caracterización organoléptica y fisicoquímica de propóleos del departamento La Libertad, Perú. The Biologist 10 (1): 34-40.

Álvarez, J.; J. Granadillo & C. Tabio. 2006. La cromatografía en capa delgada como método para la clasificación del propóleo cubano. Cienc Tec Agric Apicultura, 5(1):51-60.

Bankova, V. 2000. Control de calidad y normalización de propóleos. Problemas y soluciones. Actas del Congreso Internacional de Propóleos. Buenos Aires, Argentina.

Bruneton, J. 2001. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales, 2da. ed. Edit. Acribia, Valencia, España.

Carrillo, M.; L. Castillo & R. Mauricio. 2011. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (Mexico). Información Tecnológica 22(5): 21-28.

Castro, V. 2005. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans* por papaina y Sanitrend. Tesis. Universidad de Chile, Chile: 13-15.

Chimenos, E. & J. López. 2010. Efectividad de los colutorios antisépticos en el tratamiento de las lesiones inflamatorias de la mucosa oral. Actualización de conocimientos. Gaceta dental 217(1): 116-121.

Chumpitáz, R. & L. Ghezzi. 2013. Prevalencia e incidencia de caries a partir de vigilancia epidemiológica realizada a escolares en Chiclayo, Perú. Kiru 10 (2): 107-115.

Cuéllar, A.; N. Rojas & J. Martínez. 1990. Nueva estructura antimicrobiana del propóleo colectado en Cuba. Revista Cubana de Farmacia. 24 (1): 51-58.

Greenaway, W.; J. May; T. Scaysbrook & F. Whatley. 1991. Identification by Gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. Naturforsch 46 (1): 111-121.

Hegazy, A. & F. Hady. 2000. Propiedades biológicas y composición química de propóleos egipcios. Actas del Congreso Internacional de Propóleos. Buenos Aires, Argentina.

Hidalgo, R. 2006. Las metaloproteinasas y el progreso de la lesión cariosa en dentina. Rev Estomatol Herediana 16 (1): 64-68.

Horna, H. 1995. Inventario de la flora apícola y silvestre del callejón de Huaylas. Tesis. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo: 24-28.

Khayya, M.; M. Eghazaly & A. Elkhatib. 1993. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. Drugs Exp Clin Res 19 (5): 197-203.

Kinane, D. 2000. Causation and pathogenesis periodontal disease. Periodontol 25 (1): 8-20.

Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. 2da ed. Edit. Fondo Editorial, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.

Maidana, J. 1999. Propóleos. Características físicas en relación a su procedencia y origen vegetal. Revista Vida Apícola 95 (1):21-26.

Maidana, J. 2000. Efecto de la cosecha y almacenaje sobre la calidad del propóleos. Actas del Congreso Internacional de Propóleos. Buenos Aires, Argentina.

Moromi, H. 2007. Efecto antimicrobiano *in vitro* de la *Camellia sinensis* sobre bacterias orales. Odontol. Sanmarquina 10 (1): 18-20.

Mostacero, J. 2002. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. 1era ed. Edit. CONCYTEC, Trujillo, Perú.

Navarro, I. 2002. Estudio epidemiológico de salud bucodental en una población infantil adolescente de Castilla-La Mancha. Tesis. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Norma Ramal de Hungría. 1997. MSZ-08-0184-79. 1979. Propóleos. Disponible en: http://www.culturaapicola.com.ar/apunte s/propoleos/propoleo_1. PDF

Norma Rusa. 1997. RST-RSFSR-317-77. 1977. Propóleos. Disponible en: http://www.culturaapicola.com.ar/apunte s/propoleos/propoleo_1.PDF

Pascual, C.; R. González & R. Torricella. 1994. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. J Ethnopharmacol 41 (1): 9-13.

Pérez, J. 2007. Asociación del *Estreptococos mutans* y lactobacilos con la caries dental en niños. Rev Cubana Estomatol 44 (4): 2-9.

Reitinger, A. 2000. Premisas básicas para obtener bue-

nos productos apiterápicos: Miel, polen de flores, jalea real, propóleos y veneno de abejas. Actas del Congreso Internacional de Propóleos. Buenos Aires, Argentina.

Salamanca, G. 2000. El sistema de puntos críticos en la actividad apícola, extracción y beneficio del propóleos. Actas del Congreso Internacional de Propóleos. Buenos Aires, Argentina.

Sosa, A.; M. Subosky; J. Maidana & A. Castillo. 2003. Organoleptic and physical of propolis from northeasthern Argentina. Spanish Journal of Apiculture Resarch 1 (2): 37-40.

Tolosa, L. & A. Cañizares. 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de propóleo de Campeche. Ars Pharmaceutica, 43 (1), 187-204.

Vieira, A. 1999. Atividade antimicrobiana de antissépticos orais e dentifrícios para bebês: um estudo sobre células sésseis e planctônicas. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Woisky, R. & A. Salatino. 1998. Analysis of propolis. Some parameters and procedures for chemical quality control. Journal of Apiculture Research 37 (2): 99-105.